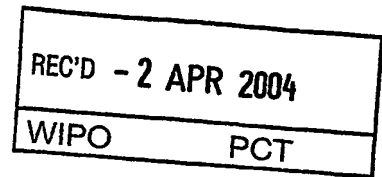


**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

REMISE DES PIÈCES DATE 17 AVRIL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0304835 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 17 AVR. 2003 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET LAVOIX 2, Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09	
Vos références pour ce dossier BFF 03P0004 <i>(facultatif)</i>			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____			
<i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Gène induit par l'insuline, comme cible thérapeutique dans le diabète.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		MERCK SANTÉ	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		572028033	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège		37 rue Saint-Romain - 69008 LYON	
Rue			
Code postal et ville		FRANCE	
Pays		Française	
Nationalité			
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° . 2 / 3 .



REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI	
DATE		17 AVRIL 2003	
LIEU		75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT		0304835	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		BFF 03P0004	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF		3, rue Michel Ange - 75016 PARIS	
Domicile ou siège		Rue Code postal et ville Pays	
Nationalité		FRANCE Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège		Rue Code postal et ville Pays	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Philippe BLOT n° 98.0404 	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. MARTIN	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

17 AVRIL 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0304835

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		CABINET LAVOIX
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves
	Code postal et ville	75441 PARIS CEDEX 09
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 53 20 14 20
N° de télécopie (facultatif)		01 48 74 54 56
Adresse électronique (facultatif)		brevets@cabinet-lavoix.com
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
Philippe BLOT n° 98.0404 		M. MARTIN

L'invention concerne l'identification du gène E2IG4 comme cible thérapeutique pour le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

5 Le diabète est une maladie métabolique hétérogène qui connaît actuellement dans le monde une croissance rapide, représentant un grave problème de santé publique. Le diabète se caractérise par une augmentation du glucose sanguin, lié à un défaut de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, soit à un défaut de capture du glucose par les tissus

10 périphériques tels que le foie, le muscle ou le tissu adipeux, définissant l'insulinorésistance (Mauvais-Jarvis F, Kahn CR, Diabetes Metab., 2000, 26(6) :433-48). En outre une proportion importante de personnes obèses développe une insulinorésistance et éventuellement un diabète.

15 Les inventeurs se sont intéressés à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques exploitables pour le traitement de ces pathologies.

Par la technique du « differential display », ils ont comparé les profils d'expression de l'ensemble des gènes hépatiques chez le rat en absence ou en présence d'insuline, et sont ainsi parvenus à identifier un gène dont

20 l'expression est induite rapidement par l'insuline.

Les inventeurs ont d'abord désigné ce gène « gène EIIH » pour Early Insulin Induced Hepatic gene. Ce gène s'avère en fait être l'homologue chez le rat du gène décrit chez l'homme sous la désignation « gène E2IG4 », pour « E-
 2-induced-gene » (Charpentier et al, Cancer Res., 2000, 60(21) :5977-83). La

25 séquence d'ADNc clonée chez le rat par les inventeurs est présentée dans le listage de séquences annexées (SEQ ID n°1). La séquence protéique correspondante (de 353 acides aminés) est présentée en SEQ ID n°2. La séquence d'ADNc clonée chez l'homme par Charpentier et al, 2000, est présentée en séquence SEQ ID n°3, et la séquence protéique correspondante

30 en SEQ ID n°4.

Dans le contexte de la présente invention, on entend par « gène E2IG4 » non seulement la séquence humaine mais également les homologues chez d'autres espèces, comme le rat ou la souris par exemple, ou tout autre

mammifère. On utilisera d'ailleurs de manière indifférente la désignation « gène EIIH » et « gène E2IG4 ». De même la protéine ou produit d'expression de ce gène, sera désignée indifféremment « protéine EIIH » ou « protéine E2IG4 ».

La présente invention vise l'utilisation de ce gène ou du produit
5 d'expression de ce gène comme cible thérapeutique pour le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance. Parmi les complications visées, on peut citer les complications macrovasculaires comme l'athérosclérose ou microvasculaires comme les rétinopathies, les néphropathies et les neuropathies.

10 Les expériences menées montrent en effet que la cinétique d'accumulation de l'ARNm de ce gène est précoce et précède celle de la glucokinase, ce qui suggère fortement que l'expression de ce gène joue un rôle dans les mécanismes de signalisation de l'insuline et dans la capture et le métabolisme du glucose. L'identification de la protéine E2IG4 comme
15 répondeur à l'insuline conduit à un certain nombre d'applications thérapeutiques et diagnostiques, objets de l'invention.

L'invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un agent modulateur de l'expression ou de l'activité du gène E2IG4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du diabète ou de ses complications, de
20 l'obésité ou de l'insulinorésistance.

Selon un aspect de l'invention, l'agent modulateur est un inhibiteur de l'activité de la protéine E2IG4, tel qu'un anticorps anti-protéine E2IG4 bloquant.

Selon un autre aspect de l'invention, l'agent modulateur est un répresseur de l'expression du gène E2IG4, tel qu'un acide nucléique anti-sens
25 du gène E2IG4.

Selon encore un autre aspect de l'invention, l'agent modulateur est un activateur de l'activité de la protéine E2IG4.

L'agent modulateur peut encore être un inducteur de l'expression du gène E2IG4.

30 L'ensemble de ces modes de réalisation est décrit plus en détails plus bas.

Par ailleurs, l'invention comprend également l'utilisation de la protéine E2IG4 ou d'un acide nucléique codant pour cette protéine (dans le cadre d'une

thérapie génique), pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

Les compositions pharmaceutiques comprenant une protéine E2IG4 ou un acide nucléique codant pour cette protéine, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, font également partie de l'invention.

L'invention a en outre pour objet une méthode de traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, chez un mammifère, plus particulièrement un humain, comprenant l'administration chez ce mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un agent modulateur de l'expression ou de l'activité du gène E2IG4.

Enfin l'invention concerne également une méthode *in vitro* pour cribler ou identifier des composés utiles dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, comprenant la mise en contact d'au moins un composé à tester avec une cellule capable d'exprimer le gène E2IG4, et l'évaluation du niveau d'expression de ce gène, une modulation (à savoir une augmentation ou une diminution, mais de préférence une augmentation) du niveau d'expression de ce gène étant indicateur d'un composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

L'invention concerne également une méthode *in vitro* pour cribler ou identifier des composés utiles dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, comprenant la mise en contact d'au moins un composé à tester avec une cellule capable d'exprimer

~~un gène-rapporteur associé de manière opérante avec le promoteur du gène~~
E2IG4, et l'évaluation du niveau d'expression du gène rapporteur, une modulation (à savoir une augmentation ou une diminution, mais de préférence une augmentation) du niveau d'expression de ce gène étant indicateur d'un composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

Cette méthode peut être mise en œuvre selon diverses techniques bien connues de l'homme du métier, par exemple en utilisant une cellule transfectée avec un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n°1.

Un autre objet de l'invention vise une méthode *in vitro* de diagnostic ou pronostic d'un diabète, d'une obésité ou d'une insulino-résistance chez un sujet, dans laquelle on détermine le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 dans un échantillon biologique d'un sujet, un niveau d'expression
 5 modifié par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle étant indicateur d'un développement ou d'un risque accru de développer un diabète, une obésité ou une insulino-résistance chez ledit sujet.

Le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 peut être déterminé de différentes manières, de préférence en évaluant la quantité de protéine
 10 E2IG4 dans un échantillon biologique d'un sujet, par exemple par les techniques classiques d'immunoessais. On peut également mesurer le taux d'expression d'ARNm transcrit à partir de ce gène.

De manière préférentielle, on cherche à détecter une diminution du niveau d'expression du produit du gène E2IG4 par rapport au sujet contrôle, une
 15 diminution indicatrice d'un développement ou d'un risque accru de développer un diabète, une obésité ou une insulino-résistance.

Thérapie génique

20 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, une thérapie génique est mise en œuvre. Il s'agit d'administrer à un patient un acide nucléique qui code pour la protéine E2IG4, dans des conditions telles que la protéine est exprimée *in vivo* par les cellules du patient dans lesquelles l'acide nucléique a été transféré.

25 L'acide nucléique administré comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N° 3, ou n° 1, ou toute séquence homologue ou similaire, définies comme :

- i) des séquences similaires à au moins 70 % de l'une des séquences identifiées ; ou
- ii) des séquences hybridant avec l'une desdites séquences
 30 identifiées ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation, ou
- iii) des séquences codant pour un polypeptide, tel que défini plus bas.

De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences identifiées, de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %, de préférence au moins 95 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue
 5 hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de l'une des séquences identifiées dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la
 10 relation : $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ (Sambrook et *al.*, 1989, Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie
 15 par la relation : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une
 20 solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de
 ———— similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et
 25 les pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de l'une des séquences identifiées, par mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique.

30 Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de mammifères autres que l'homme, de préférence d'un primate, d'un bovin, ovin ou porc, ou encore d'un autre rongeur, ainsi que les variants alléliques.

La séquence codant la protéine E2IG4 est de préférence associée à des éléments permettant la régulation de son expression, tels qu'une séquence promoteur.

Un tel acide nucléique peut être notamment sous la forme d'un vecteur d'ADN, par exemple un vecteur plasmidique.

Le vecteur d'ADN peut être introduit *in vivo* par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, il est possible d'introduire le vecteur d'ADN *in vivo* sous une forme nue, c'est-à-dire sans l'aide d'un quelconque véhicule ou système qui faciliterait la transfection du vecteur dans les cellules (EP 465 529).

Un canon à gènes peut être également employé, par exemple en déposant l'ADN à la surface de particules « en or » et en projetant celles-ci de manière à ce que l'ADN pénètre à travers la peau d'un patient. Des injections, au moyen d'un gel liquide sont également possibles pour transfecter à la fois la peau, muscle, tissu gras et tissu mammaire.

Des techniques de microinjection, électroporation, précipitation au phosphate de calcium, formulations à l'aide de nanocapsules ou de liposomes sont d'autres techniques disponibles.

Des nanoparticules en polyalkyl cyanoacrylate biodégradables sont particulièrement avantageuses. Dans le cas de liposomes, l'utilisation de lipides cationiques favorise l'encapsulation des acides nucléiques qui sont chargés négativement, et facilite la fusion avec les membranes cellulaires chargées négativement.

De manière alternative, le vecteur peut être sous la forme d'un virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence d'acide nucléique qui code pour le ou lesdits peptide(s).

Le vecteur viral peut être de préférence choisi parmi un adénovirus, un rétrovirus, en particulier un lentivirus, ainsi qu'un virus adéno-associé (AAV), un virus de l'herpès, un cytomégalovirus (CMV), un virus de la vaccine, etc.

Des vecteurs lentivirus ont par exemple été décrits par Firat et al., (2002), J. Gen. Ther. 4:38-45.

De manière avantageuse, le virus recombinant est un virus défectif. Le terme « virus défectif » désigne un virus incapable de se répliquer dans une

cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs est dénué d'au moins les séquences nécessaires pour la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées, soit rendues non fonctionnelles ou encore substituées par d'autres séquences et en particulier par l'acide nucléique qui code pour le peptide d'intérêt. Néanmoins, de préférence, le virus défectif conserve malgré tout les séquences de son génome qui sont nécessaires pour l'encapsulation des particules virales.

Thérapie protéique ou peptidique

Dans un autre mode de réalisation, l'augmentation de protéine E2IG4 chez le patient peut être obtenue en administrant au patient une protéine E2IG4 exogène, de préférence purifiée, et éventuellement modifiée chimiquement ou enzymatiquement pour améliorer sa stabilité ou sa biodisponibilité.

Par "*protéine E2IG4 exogène*", on entend toute protéine comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 4 ou n° 2, ou toutes séquences variantes, homologues ou dérivées, définies comme des séquences similaires à au moins 70 %, de préférence au moins 80 %, de préférence encore au moins 90 %, voire au moins 95 %, de la séquence de référence.

Ces séquences peuvent également être définies comme comprenant les séquences codées par une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence de référence ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

~~Le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité~~
entre les acides aminés comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales

apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par "*séquence d'acides aminés variante, homologue, ou dérivée*", on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence de référence par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou plusieurs acides aminés, de préférence d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique de la protéine.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

De préférence, les peptides « variants », « homologues », ou « dérivés » sont de même longueur que les séquences de référence.

La protéine E2IG4 peut être synthétisée par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier, par exemple par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

Une protéine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant l'une des séquences identifiées ou une séquence homologue est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant.

La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

Agents modulateurs et méthodes de criblage

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la modulation de l'activité de la protéine E2IG4, à savoir son activation ou son inhibition, peut être réalisée par mise en œuvre d'agents modulateurs divers, par exemple identifiés par des méthodes de criblage.

Un objet de l'invention est ainsi une méthode pour cribler ou identifier 15 des composés utiles dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, comprenant la mise en contact d'au moins un composé à tester avec une cellule capable d'exprimer le gène E2IG4, et l'évaluation du niveau d'expression de ce gène, une modulation (à savoir une augmentation ou une diminution, de préférence une augmentation) du niveau 20 d'expression de ce gène étant indicateur d'un composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

Le niveau d'expression du gène E2IG4 chez les cellules soumises au composé à tester peut être comparé au niveau d'expression contrôle, des cellules qui ne sont pas soumises au composé.

25 Le composé à tester peut être de n'importe quel type. Il peut s'agir de composés ou mélanges de composés, naturels ou synthétiques. Il peut également s'agir d'une substance structurellement définie ou de structure inconnue, par exemple un extrait biologique.

Les cellules mises en œuvre dans les méthodes de criblage peuvent 30 être des cellules exprimant naturellement E2IG4, telles que des cellules FAO, H4IIE, AtT20, MCF-7 ou INS-1, ou peuvent être des cellules hôtes transfectées, de manière transitoire ou stable, par des vecteurs d'expression du produit du gène E2IG4. Ces cellules peuvent être obtenues par

l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

5 Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des cellules de mammifères, telles que les cellules CHO, COS-7, 293, MDCK, des cellules d'insectes telles que les cellules SF9, des bactéries telles que E. coli et des souches de levures.

Le niveau d'expression peut être évalué en déterminant le niveau de transcription du gène ou le niveau de traduction de la protéine codée par ce gène E2IG4, directement ou par le biais d'un gène rapporteur par exemple.

Les tests les plus courants pour suivre la transcription (c'est à dire déterminer le niveau de transcription) du gène cible (ici le gène E2IG4) ou du gène rapporteur font appel à la technique du Northern Blot. Les tests pour
15 suivre la traduction (c'est à dire déterminer le niveau de traduction) de la protéine E2IG4 ou de la protéine rapporteur peuvent notamment faire appel aux techniques d'immunoessais, ou utiliser les techniques de détection fluorométriques, luminescentes ou autres, des protéines rapporteurs (Green Fluorescent Protein GFP ; Luciférase ; Chloramphenicol acetyltransferase
20 CAT, etc).

Les techniques d'immunoessais peuvent être réalisées selon divers formats bien connues de l'homme du métier, par exemple par dosage ELISA, radioimmunoessai, immunoessais *in situ*, Western blot, immunofluorescence, etc. Les anticorps anti-protéine E2IG4 utiles pour détecter la protéine E2IG4
25 peuvent être produits comme décrits ci-après.

Anticorps

La présente invention comprend également la production d'anticorps anti-protéine E2IG4, qui peuvent être utiles dans les méthodes de criblage
30 décrites plus haut, ou en tant qu'agents modulateurs d'intérêt, en particulier en tant qu'agents inhibiteurs de l'activité de la protéine E2IG4, et ce d'autant plus qu'ils présentent un pouvoir bloquant. On parle alors d'anticorps inhibiteurs.

Les anticorps utiles selon l'invention peuvent être des anticorps monoclonaux ou des sérums polyclonaux, de préférence monospécifiques.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de fusion lymphocytaire et culture d'hybridomes décrite par Köhler et
 5 Milstein, *Nature*, 1975, 256 : 495-497. D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues (Harlow et al, ed., 1988 «
 Antibodies : a laboratory manual »). Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés en immunisant un mammifère (par exemple une souris, un rat, un
 10 lapin, voire un être humain, etc...) et en utilisant la technique de fusion lymphocytaire conduisant à des hybridomes (Köhler et Milstein, 1975).

Des techniques alternatives à cette technique usuelle existent. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide
 nucléique cloné à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage (« phage display »), en
 15 introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour *E.coli*, Scott, J.K. et Smith, G.P., *Science*,
 1990, 249 :386-390). Des protocoles de construction de ces banques d'anticorps sont décrits dans Marks et al, 1991, *J. Mol. Biol*, 222 :581-597.

20 Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre un antigène de nature peptidique selon les modes opératoires usuels. On peut ainsi comme antigène la protéine E2IG4 ou un fragment peptidique approprié de celle-ci, pouvant être couplé par
~~l'intermédiaire d'un résidu réactif à une protéine ou un autre peptide. Des lapins~~

25 sont immunisés avec l'équivalent de 1mg de l'antigène peptidique. A des intervalles de quatre semaines, les animaux sont traités par des injections de 200 µg d'antigène et saignés 10 à 14 jours plus tard. Après la troisième injection, l'anti-sérum est examiné pour déterminer sa capacité à se lier au peptide antigène radiomarké à l'iode, préparé par la méthode chloramine-T et
 30 est ensuite purifié par une chromatographie sur colonne échangeuse d'ion carboxyméthyl cellulose (CMC). Les molécules d'anticorps sont ensuite recueillies dans les mammifères et isolées jusqu'à la concentration souhaitée

par les méthodes bien connues de l'homme de l'art, par exemple, en utilisant DEAE Sephadex pour obtenir la fraction IgG.

Autres agents inhibiteurs

5 Parmi les agents modulateurs utiles selon l'invention, peuvent également être utilisés des fragments peptidiques de la protéine E2IG4, qui inhibent l'activité de la protéine E2IG4 par interaction avec celle-ci ou avec un de ses effecteurs.

Répression de la transcription

10 Selon un aspect de l'invention, la modulation de l'expression de E2IG4 est réalisée en inhibant ou réprimant la transcription du gène. L'homme du métier sait choisir la stratégie la plus adaptée dans ce but.

Par exemple, des acides nucléiques antisens, dont les ribozymes, 15 peuvent être utilisés. Une thérapie antisens met généralement en œuvre un vecteur, tel qu'un vecteur viral, qui porte la séquence antisens, l'inhibition étant alors généralement stable puisque le vecteur va s'intégrer dans le génome. On peut également utiliser des oligonucléotides antisens, qui procurent une inhibition transitoire de l'expression.

20 On peut également mettre à profit la technologie des ARN interférents (siRNAs), qui empêche un gène de produire une protéine fonctionnelle en détruisant l'ARN messager (Bass, Cell, 2000, 101:235-238 ; Sharp, Genes Dev. 2001, 15:485:490).

Compositions pharmaceutiques

25 Un objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant, en tant que principe actif, un agent modulateur de l'expression ou de l'activité du gène E2IG4 avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables. Comme décrit plus haut, cet agent 30 modulateur peut être un composé de synthèse chimique, un ARN antisens ou interférent, ou encore un anticorps anti-E2IG4.

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant, en tant que principe actif, une protéine E2IG4 ou acide nucléique

qui comprend une séquence codant pour cette protéine, avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

Par "excipient" ou "véhicule pharmaceutiquement acceptable", on entend tout solvant, milieu de dispersion, agents retardant l'absorption etc, qui ne produisent pas de réaction secondaire, par exemple allergique, chez l'humain ou l'animal.

La posologie dépend naturellement de l'actif considéré, du mode d'administration, de l'indication thérapeutique, de l'âge du patient et de son état.

La dose de protéine ou d'anticorps est préférablement de 0,1 à 250 mg/kg par jour, de préférence de 1 à 100 mg/kg par jour.

Quand les compositions pharmaceutiques comprennent des acides nucléiques, les doses d'acide nucléique (séquence ou vecteur) à administrer sont adaptées également en fonction notamment du mode d'administration, de la pathologie ciblée ainsi que de la durée de traitement. Généralement, lorsque des virus recombinants sont utilisés, ceux-ci sont formulés et administrés sous la forme de doses d'environ 10^4 à 10^{14} pfu/ml, de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme « pfu » (unité formant plaque) correspond à l'infectivité d'une solution virale, et peut être déterminée en infectant une culture cellulaire appropriée et en mesurant, généralement après 48 heures, le nombre de plaques de cellules infectées. Les techniques pour déterminer le titre pfu d'une solution virale sont bien décrites par la littérature.

Lorsque l'administration par voie parentérale est envisagée, plus particulièrement par injection, les compositions de l'invention comprenant le ou les principes actifs se trouvent sous la forme de solutés et suspensions injectables conditionnées en ampoules ou flacons pour perfusion lente. L'injection peut notamment être réalisée par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse.

Dans le cas d'une administration par voie orale, les compositions de l'invention se trouvent sous la forme de gélules, comprimés effervescents, comprimés nus ou enrobés, sachets, dragées, ampoules ou solutés buvables, microgranules ou formes à libération prolongée.

Les formes pour l'administration parentérale sont obtenues de façon conventionnelle par mélange du ou des principes actifs avec des tampons, des agents stabilisants, des conservateurs, des agents solubilisants, des agents isotoniques et des agents de mise en suspension. Conformément aux techniques connues, ces mélanges sont ensuite stérilisés puis conditionnés sous la forme d'injections intraveineuses.

A titre de tampon, l'homme du métier pourra utiliser des tampons à base de sels de phosphate organique.

Des exemples d'agents de mise en suspension englobent le méthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, l'acacia et la carboxyméthylcellulose sodique.

En outre, des stabilisants utiles selon l'invention sont le sulfite de sodium et le métrasulfite de sodium, tandis que l'on peut citer le p-hydroxybenzoate de sodium, l'acide sorbique, le crésol et le chlorocrésol en tant que conservateurs. Pour la préparation de solution ou de suspension orale, les principes actifs sont dissous ou mis en suspension dans un véhicule approprié avec un agent dispersant, un agent humectant, un agent de mise en suspension (par exemple la polyvinylpyrrolidone), un conservateur (tel que le méthylparaben ou le propylparaben), un agent correcteur de goût ou un colorant.

Pour la préparation de microcapsules, les principes actifs sont combinés à des diluants appropriés, des stabilisants appropriés, des agents favorisant la libération prolongée des substances actives ou tout autre type d'additif pour la formation d'un noyau central qui est ensuite revêtu d'un polymère approprié (par exemple une résine hydrosoluble ou une résine insoluble dans l'eau). Les techniques connues de l'homme du métier seront utilisées à cet effet.

Les microcapsules ainsi obtenues sont ensuite éventuellement formulées dans des unités de dosage appropriées.

Une administration par voie oculaire peut également être envisagée.

La composition pharmaceutique de l'invention se présente alors sous la forme d'une composition ophtalmique pour administration locale dans l'œil, par exemple comme un collyre, ou une crème ophtalmique.

Les agents modulateurs ou les composés protéiques peuvent également être formulés sous la forme de liposomes. Les liposomes sont formés à partir

de phospholipides qui sont dispersés dans un milieu aqueux et forment spontanément des vésicules bicouches concentriques multilamellaires. Ces vésicules ont généralement un diamètre de 25 nm à 4 µm et peuvent être soniquées, conduisant à la formation de vésicules plus petites unilamellaires, de diamètre de 200 à 500 Å, contenant une solution aqueuse en leur cœur.

Les liposomes peuvent être particulièrement avantageux pour administrer le médicament à une cible cellulaire ou tissulaire précise. Pour cela, les lipides peuvent être couplés chimiquement à des molécules de ciblage, tels que des peptides de ciblage (par exemple hormones), ou des anticorps.

Applications diagnostiques

Selon un autre aspect de l'invention, l'identification du gène E2IG4 comme gène répondeur à l'insuline ouvre des applications pour le diagnostic ou pronostic d'un diabète, d'une obésité ou d'une insulino-résistance chez un sujet.

De manière générale, le terme « diagnostic » se comprend comme la détermination ou la confirmation d'une pathologie chez un sujet.

Le sujet ou patient peut être un mammifère, plus particulièrement un humain, quel que soit son âge, sexe, et état de santé. Le sujet testé peut être asymptomatique, ou considéré comme étant susceptible de ou prédisposé à développer un diabète, une obésité ou une insulino-résistance, notamment en raison de ses antécédents familiaux. On parlera alors d'ailleurs plutôt de

«-prognostic-».

Le sujet « contrôle » peut être un sujet sain. Dans le cas où l'on cherche à suivre l'évolution d'une des pathologies citées, il est utile de déterminer à un moment donné le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 chez un sujet test, puis de déterminer de nouveau ce niveau d'expression ultérieurement, à un autre moment (l'intervalle de temps pouvant être de l'ordre de plusieurs semaines, mois, voire années). Le sujet « contrôle » lors de cette deuxième détermination est alors le sujet « test » lors de la première détermination.

Le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 peut être déterminé de différentes manières, de préférence en détectant et/ou quantifiant la protéine E2IG4 dans un échantillon biologique d'un sujet.

Par « échantillon biologique », on entend notamment du sang, sérum, urine, ou encore une biopsie tissulaire.

La quantité de protéine E2IG4 peut être déterminée par exemple par les techniques classiques d'immunoessais, incluant les essais par compétition, par réaction directe, ou de type sandwich. On peut citer notamment les Western blots, ELISA, RIA, immunoprécipitation, etc. Les réactions mettent généralement en œuvre des marqueurs de révélation, tels que des marqueurs fluorescents, radioactifs ou enzymatiques. Pour ces techniques d'immunoessais, on utilise un anticorps dirigé contre la protéine E2IG4, comme décrit plus haut, de préférence un anticorps monoclonal.

On peut également mesurer le taux d'expression d'ARNm transcrit à partir du gène E2IG4. Pour cela, on extrait généralement l'ARNm d'un échantillon biologique (par exemple un échantillon de cellules ou de tissu) selon les techniques standard, puis on soumet cet ARNm à des techniques d'hybridation (par exemple de type Northern Blot) et /ou d'amplification (par exemple PCR), à l'aide d'oligonucléotides hybridant spécifiquement avec la séquence du gène E2IG4. Les complexes d'hybridation formés ou les produits d'amplification sont ensuite détectés à l'aide de ligands fluorescents, radioactifs, enzymatiques, ou autres.

Les exemples et figures suivantes illustrent l'invention sans en limiter sa portée.

LEGENDE DES FIGURES :

Figure 1 : La figure 1 est un graphe représentant la mesure de l'effet de l'insuline sur le niveau d'expression d'un gène contrôle (la glucokinase hépatique) chez des rats STZ.

Figure 2 : La figure 2 est un graphe représentant la mesure de l'effet de l'insuline sur le niveau d'expression du gène E1IH chez des rats STZ.

EXEMPLES :

Exemple 1 :

5 Identification par Differential Display du gène EIIH induit par l'insuline, et clonage de ce gène

Les inventeurs ont choisi des modèles développés à partir de rats allaités, âgés de 12 jours (12DR), n'ayant jamais été exposés à des taux effectifs d'insuline.

10 Plusieurs observations rapportant l'effet de l'insuline sur l'expression du gène de la glucokinase, ont orienté ce choix de modèles expérimentaux. La glucokinase est utilisée dans cette étude comme référence et contrôle de l'action de l'insuline au niveau hépatique.

Il a notamment été rapporté que dans le foie, l'insuline contrôle
15 l'expression de la glucokinase au niveau transcriptionnel (Magnuson et al., 1989, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86(13):4838-42).

Par ailleurs, chez le rat, la glucokinase hépatique apparaît pour la première fois au cours de la transition allaitement/sevrage (animal âgé de 2 à 3 semaines) (Iynedjian et al., 1987, J. Biol. Chem. 262(13):6032-8). Les facteurs
20 protéiques nécessaires sont donc exprimés à cette période.

Lors de la mise en culture d'hépatocytes de rats n'ayant jamais exprimé la glucokinase, l'addition d'insuline induit l'accumulation des ARN messagers spécifiques avec une période de latence de 18 à 24 heures. Il a été montré par
~~Bossard et al., 1994, Eur. J. Biochem., 223(2):371-80 que ce délai est~~
25 nécessaire à la traduction d'une ou plusieurs protéines régulées par l'insuline.

A partir de ces observations, les inventeurs se sont intéressés à l'action de l'insuline sur l'expression de gènes cibles tels que la glucokinase par l'intermédiaire d'effecteurs qui doivent être néo-synthétisés au moment de la première induction du gène. Pour identifier ces effecteurs, les inventeurs ont
30 choisi d'étudier l'ensemble des gènes induits à cette période particulière dans deux modèles complémentaires :

- Modèle *in vivo* : l'administration d'une charge orale de glucose à des rats allaités âgés de 12 jours (12DR) conduit à une augmentation de leur

insulinémie, entraînant l'induction de l'ensemble des gènes insulino-dépendants. En prélevant leur foie à différents temps, on peut suivre l'accumulation des ARN messagers des gènes stimulés par l'insuline.

- Modèle *in vitro* : les hépatocytes de rats âgés de 12 jours sont mis en culture dans des conditions basales sans insuline et sans glucose. L'addition d'insuline au milieu de culture induit l'accumulation progressive des ARN messagers des gènes régulés par cette hormone.

La complémentarité de ces deux modèles présente plusieurs avantages:

- l'utilisation d'un modèle *in vivo* permet l'étude des gènes chez l'animal, dans des conditions physiologiques.
- le modèle *in vitro* permet d'observer les gènes induits par l'insuline, indépendamment de l'effet du glucose.

Ainsi, en choisissant les gènes induits à la fois *in vitro* et *in vivo*, les inventeurs ont sélectionné les gènes induits par l'insuline seule.

15

Matériels et méthodes

a) Culture primaire des hépatocytes et préparation des ARN :

6/8 animaux (rats Wistar) âgés de 10 jours, sont anesthésiés avec du pentobarbital, les foies sont perfusés et les hépatocytes sont isolés comme décrit dans Narkewicz et al., 1990, Biochem J., 271(3):585-9. Les cellules sont ensemencées à une densité de 8.10^6 cellules par boîte de culture 100 mm dans un milieu M199 (Gibco), contenant 0,1 % de BSA, des antibiotiques et 2% d'Ultroser. Après quatre heures d'adhérence, le milieu est remplacé par un milieu de culture M199 sans glucose, complémenté avec des antibiotiques, du lactate et pyruvate ainsi que de l'insuline (100 nM). La culture est arrêtée à différents temps (entre 0 et 24 heures) après l'addition d'insuline. Les cellules sont lavées deux fois dans un tampon PBS, puis lysées dans un tampon pour la préparation d'ARN selon le protocole décrit par Chirgwin et al., 1979, Biochemistry, 18(24):5294-9.

30

b) Prélèvement des foies et préparation des ARN :

6 rats (Wistar) âgés de 10 jours sont isolés de leur mère trois heures avant administration d'une charge orale de glucose (200 mg/animal). Un animal est sacrifié consécutivement au gavage (T 0 H). Les autres sont sacrifiés

toutes les heures (T 1 H à T 5 H). Les foies sont prélevés puis broyés immédiatement après la mort de l'animal. Les ARN sont préparés selon le protocole commercial RNeasy (Qiagen).

c) Differential display :

5 Les ADNc totaux sont synthétisés par transcription inverse par l'Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) à partir de chacune des préparations d'ARN décrites ci-dessus. La procédure du Differential Display suit le protocole du kit DELTA Differential Display (Clontech). Les ADNc ont été amplifiés par PCR en utilisant consécutivement des couples d'amorces

10 aléatoires selon les conditions de PCR suivantes : trois cycles de 5 minutes à 94°C, 2 minutes à 40°C, 5 minutes à 68°C, puis 30 cycles de 45 secondes à 94°C, 1 minute à 60°C et 2 minutes à 68°C et enfin 7 minutes à 68°C. Les produits de PCR ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 4,5 % (Genomix). L'ADNc EIIH a été synthétisé en utilisant le

15 couple d'oligonucléotides P6 : 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3' (SEQ ID N° 5) et T11 : 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTTTG-3' (SEQ ID N° 6). Cet ADN a été excisé du gel, élué, réamplifié par PCR avec les primers P6 et T11 puis séquencé.

d) Amplification rapide des extrémités de l'ADNc (RACE) :

20 Pour obtenir l'ADNc complet du gène EIIH, les inventeurs ont suivi la procédure commerciale de SMART RACE (Clontech), puis ont utilisé les amorces U6 : 5'-ACGCGGGGGGGTGCCTAGGTG-3' (SEQ ID N°7) et

L10 : 5'-GATGGAAAGAGCTCTTACATGTGTTTATT-3' (SEQ ID N°8)

correspondant respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc, pour

25 synthétiser puis cloner l'ADNc complet.

Résultats

Pour identifier de nouveaux gènes hépatiques régulés par l'insuline, les inventeurs ont utilisé la technique du Differential Display. L'étude préférentielle

30 a été menée en parallèle sur chacun des modèles *in vitro* et *in vivo* décrits ci-dessus. Le critère de sélection portait sur les produits de PCR amplifiés seulement en présence d'insuline.

Sur 110 gènes, 30 présentaient un caractère différentiel. Ces 30 gènes candidats ont été clonés, puis le caractère différentiel de ces gènes a de nouveau été testé par RT-PCR semi-quantitative, dans différentes conditions d'incubation par l'insuline dans le foie et les hépatocytes en culture. Ce test a notamment permis d'écarter les faux-positifs, et les gènes répondeurs connus.

Finalement, le couple d'amorces P6 et T11 a généré un fragment d'ADN de 800 pb dont le profil différentiel correspondait aux critères de sélection et qui a été appelé EIIH. En utilisant cet ADN comme sonde par Northern Blot, les inventeurs ont détecté un signal de 2,5 kb correspondant à la taille de l'ARN messager exprimé dans le foie.

L'ADNc EIIH de pleine longueur a ensuite été synthétisé par PCR à partir de la séquence obtenue par les expériences de 5' et 3' RACE.

L'analyse informatique de cette séquence indique la présence d'une ORF (cadre ouvert de lecture) codant une protéine.

Afin de savoir si cette protéine était traduite, les inventeurs ont cloné l'ADNc dans un vecteur d'expression : pTarget(TM) Mammalian Expression System (Promega). Des expériences de transcription/traduction *in vitro* (TNT Coupled Reticulocyte Lysate System, promega) réalisées sur cette construction montrent que le gène EIIH code pour une protéine de taille apparente sur gel d'acrylamide de 35kD (Taille théorique attendue=38kD).

Exemple 2 :

Etude de la localisation intracellulaire de la protéine

Afin de connaître la localisation intra-cellulaire de cette protéine, les inventeurs ont exprimé dans des cellules, la protéine EIIH fusionnée à une autre protéine, la green fluorescent protein (GFP) facilement détectable par fluorescence directe en microscopie.

Pour cela, la séquence codante de l'ADNc EIIH a été clonée dans un vecteur adéquat (pEGFP-N1), permettant d'exprimer la GFP en fusion avec la partie C terminale de la protéine EIIH dans des cellules préalablement transfectées avec ce plasmide (expression transitoire).

a)- Transfection de cellules COS avec le plasmide exprimant la protéine EIIH fusionnée à la GFP :

Les cellules COS sont transfectées avec la construction plasmidique décrite plus haut et en utilisant la technique Lipofectamine.

5 L'observation en microscopie à fluorescence montre qu'environ 40 % des cellules sont fluorescentes. Le marquage est intense et semble être concentré en certains points des cellules.

L'observation de ces cellules en microscopie confocale permet d'affiner la vision de la localisation cellulaire de la protéine EIIH-GFP. Dans ce but, les
10 inventeurs ont reproduit ces expériences et étalé puis fixé les cellules (au paraformaldéhyde) sur lamelles, qui sont visualisées en microscopie confocale.

La fluorescence observée dans ces cellules est intense et semble être concentrée en certains points localisés dans le cytoplasme (pas de fluorescence observée dans le noyau ou à la membrane plasmique). La
15 répartition de ce marquage indique que cette protéine n'est pas cytosoluble, mais semble plutôt être associée à des micro-organelles cytoplasmiques qui peuvent être le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi et/ou des structures de type vésiculaire (sécrétion ou autres). Les inventeurs ont remarqué la présence constante d'un marquage fluorescent plus intense dans
20 une zone proche du noyau qui pourrait être l'appareil de Golgi. L'association de cette protéine à des structures vésiculaires suggère qu'elle puisse être sécrétée.

~~b)- Étude de la localisation intracellulaire de la protéine de fusion EIIH-~~

25 GFP dans les cellules CHO-IR

Dans le but de confirmer ces résultats, des cellules CHO exprimant le récepteur de l'insuline de façon constitutive (CHO-IR) ont été transfectées avec le plasmide exprimant la protéine de fusion EIIH-GFP.

L'observation de ces cellules en microscopie confocale indique que la
30 localisation intracellulaire de la protéine de fusion EIIH-GFP est semblable à celle observée précédemment dans les cellules COS.

Exemple 3 :**Expression du gène EIIH dans différentes lignées cellulaires**

Les inventeurs ont ensuite étudié l'expression du gène EIIH dans un tissu (placenta) et des lignées cellulaires différentes de celles testées
 5 précédemment : placenta, FAO, HepG2, H4IIE, AtT20, HIT, MCF-7 et INS-1. D'après l'analyse en Northern blot, ce gène ne semble pas être exprimé dans les cellules HepG2, et les cellules HIT. En revanche, le gène est exprimé dans le placenta de rat, les cellules FAO et AtT20, ainsi que MCF-7 et INS-1 et à un niveau moindre dans les cellules H4IIE.

10

Exemple 4 :**Effets de l'insuline sur l'expression du gène EIIH chez le rat**

Le gène EIIH est exprimé dans le foie de rat allaité consécutivement à
 15 une administration de glucose (c'est-à-dire après une augmentation de l'insulinémie), et dans des hépatocytes en culture primaire après addition de l'insuline dans le milieu de culture.

Par Northern Blot, les inventeurs ont étudié plus précisément les cinétiques d'induction de ce gène dans le foie. Il a ainsi été déterminé que :

20 - l'addition d'insuline à des hépatocytes d'animaux âgés de 12 jours en culture primaire entraîne une accumulation rapide et transitoire des ARN messagers EIIH. En effet, on observe un pic d'expression de ce gène en moyenne trois heures après l'ajout d'insuline. Cette observation est reproduite sur des hépatocytes d'animaux adultes (à jeun), suggérant un rôle de ce gène
 25 consécutif à l'insuline, quel que soit l'âge de l'animal.

- *in vivo*, dans les foies d'animaux âgés de 12 jours, le gène EIIH est induit en moins d'une heure après stimulation par l'insuline.

Par ailleurs, douze rats adultes ont été traités avec de la streptozotocine. 3 jours après l'injection, 6 rats ont des glycémies comprises entre 350 et
 30 500mg/dl. Le foie de 4 rats a ensuite été prélevé (condition basale). Les inventeurs ont injecté de l'insuline (20U/kg) aux 2 autres rats et prélevé leur foie 2h après l'injection. Après avoir préparé les ARN à partir de ces différents organes, ils ont mesuré le taux d'expression du gène par la technique de PCR

en temps réel et comparé l'expression du gène avant et après le traitement par l'insuline. L'injection d'insuline à des rats STZ entraîne une augmentation de l'expression du gène EIIH d'un facteur 3, confirmant *in vivo* l'effet stimulateur de l'insuline seule sur le niveau d'expression du gène EIIH.

5 Les résultats de deux expériences indépendantes sont représentés aux figures 1 et 2.

Dans toutes les expériences menées, on a remarqué que la cinétique d'accumulation de l'ARN messenger EIIH est précoce et précède celle de la glucokinase.

10

Exemple 5 :

Expression du gène EIIH sous l'effet de l'insuline chez la souris

15 Les inventeurs ont étudié par Northern blot, l'expression et la régulation du gène EIIH par l'insuline chez la souris. Pour cela ils ont administré une charge orale de glucose à des souris préalablement mises à jeun et ils les ont sacrifiées à différents temps 0,1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 10h. Les inventeurs ont observé une induction du gène EIIH au cours du temps, semblable à celle observée chez le rat.

20 Ce résultat renforce le lien entre l'expression du gène EIIH et l'effet de l'insuline puisqu'il permet d'étendre les résultats obtenus chez le rat à une autre espèce animale, la souris, indiquant que cet effet n'est pas une particularité du rat.

REVENDECATIONS

- 5 1. Utilisation d'un agent modulateur de l'expression ou de l'activité du gène E2IG4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.
2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'agent modulateur est un activateur de l'activité de la protéine E2IG4.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'agent modulateur est un inducteur de l'expression du gène E2IG4.
4. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'agent modulateur est un inhibiteur de l'activité de la protéine E2IG4.
- 15 5. Utilisation selon la revendication 4, dans laquelle l'agent modulateur est un anticorps anti-protéine E2IG4 bloquant.
- 20 6. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'agent modulateur est un répresseur de l'expression du gène E2IG4.
7. Utilisation selon la revendication 6, dans laquelle l'agent modulateur est un acide nucléique anti-sens du gène E2IG4.
- 25 8. Utilisation selon la revendication 6, dans laquelle l'agent modulateur est un ARN interférent (ARNi) bloquant l'expression du gène E2IG4.
9. Composition pharmaceutique comprenant la protéine E2IG4, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 30

- 10.Utilisation du produit du gène E2IG4, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.
- 5 11.Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique codant pour la protéine E2IG4, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 10 12.Utilisation d'un acide nucléique codant pour la protéine E2IG4 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.
- 15 13.Méthode *in vitro* pour cribler ou identifier des composés utiles dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, comprenant la mise en contact d'au moins un composé à tester avec une cellule capable d'exprimer le gène E2IG4, ou et l'évaluation du niveau d'expression de ce gène, une modulation du niveau d'expression de ce gène étant indicateur d'un composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.
- 20
- 14.Méthode selon la revendication 13, dans laquelle la cellule est une cellule transfectée avec un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n°1.
- 25
- 15.Méthode *in vitro* pour cribler ou identifier des composés utiles dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance, comprenant la mise en contact d'au moins un composé à tester avec une cellule capable d'exprimer un gène rapporteur associé de manière opérante avec le promoteur du gène E2IG4, et l'évaluation du niveau d'expression du gène rapporteur, une modulation du niveau d'expression de ce gène étant indicateur d'un
- 30

composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

5 16. Méthode selon l'une des revendications 13 à 15, dans laquelle l'augmentation du niveau d'expression du gène E2IG4 ou du gène rapporteur, est indicateur d'un composé utile dans le traitement du diabète ou de ses complications, de l'obésité ou de l'insulinorésistance.

10 17. Méthode *in vitro* de diagnostic ou pronostic d'un diabète, d'une obésité ou d'une insulinorésistance chez un sujet, dans laquelle on détermine le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 dans un échantillon biologique d'un sujet, un niveau d'expression modifié par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle étant indicateur d'un développement ou d'un risque accru de développer un diabète, une
15 obésité ou une insulinorésistance chez ledit sujet.

18. Méthode selon la revendication 17, dans laquelle le niveau d'expression du produit du gène E2IG4 est déterminé en évaluant la quantité de protéine E2IG4 dans un échantillon biologique d'un sujet.

20

19. Méthode selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle une diminution du niveau d'expression du produit du gène E2IG4 par rapport au sujet contrôle est indicatrice d'un développement ou d'un risque accru de
~~développer un diabète, une obésité ou une insulinorésistance.~~

25

20. Anticorps monoclonal ou polyclonal anti-protéine E2IG4.

21. Répresseur de l'expression du gène E2IG4, lequel est un anti-sens du gène E2IG4.

30

22. Répresseur de l'expression du gène E2IG4, ledit anti-sens du gène E2IG4 étant un ARN interférent (ARNi) bloquant l'expression du gène E2IG4.

1/2

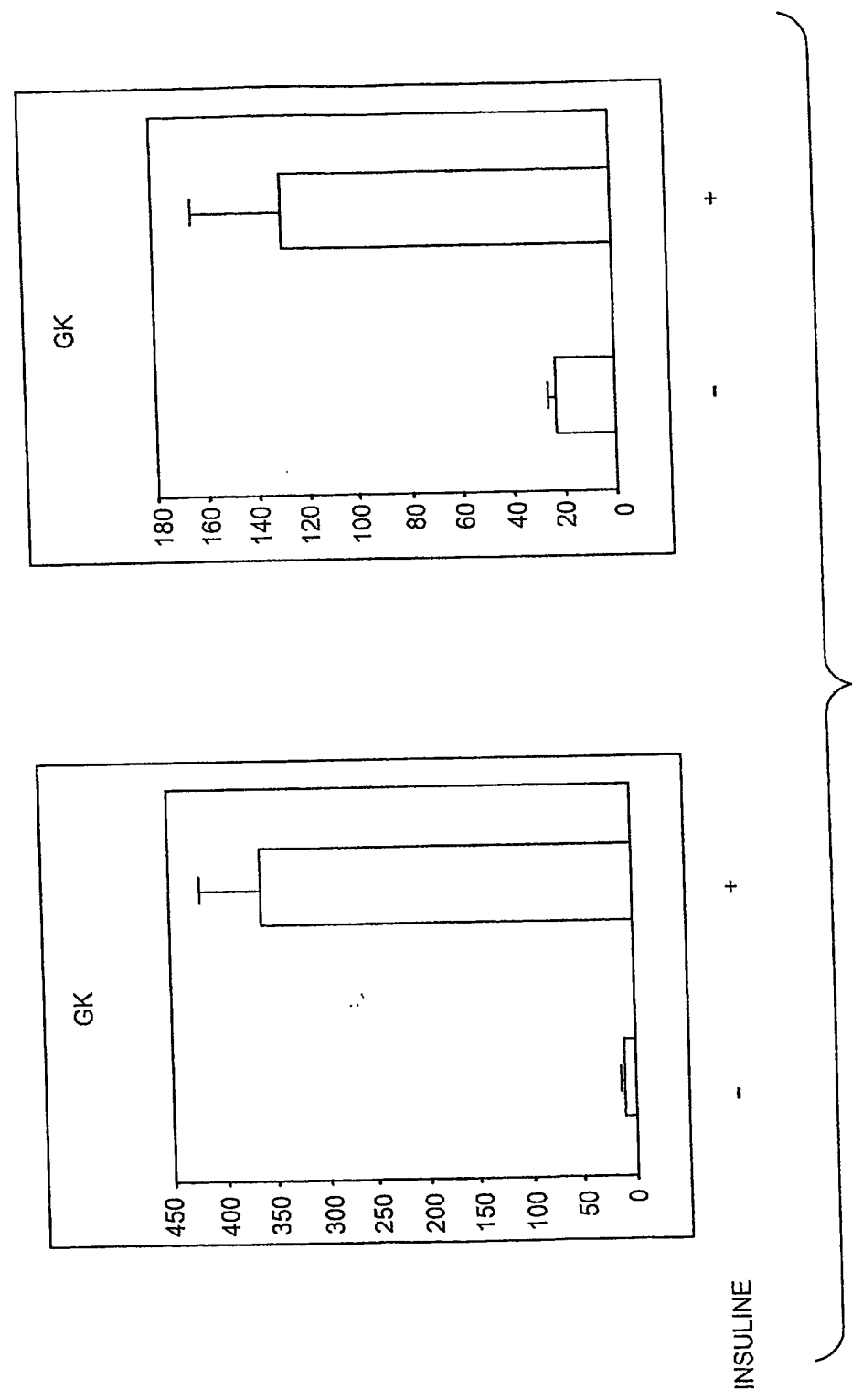
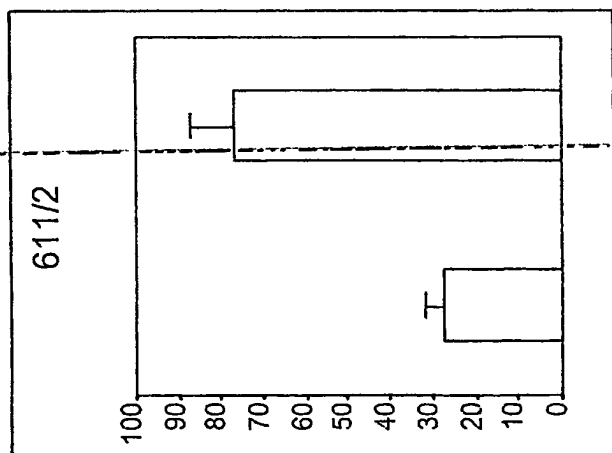
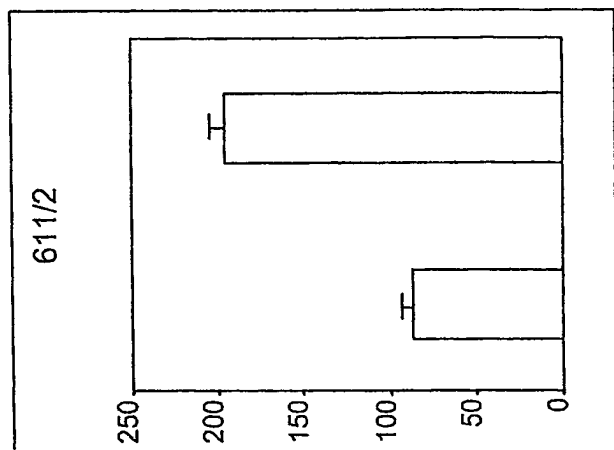


FIG.1

2/2



INSULINE

FIG. 2

SEQUENCE LISTING

<110> MERCK-SANTE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

<120> Gène induit par l'insuline, comme cible thérapeutique dans le diabète

<130> BFF 03P0004

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1062

<212> ADN

<213> Rattus sp.

<400> 1
atggtgtgca ccctgttcct gctactgctg gccctgggca tagtgcagac aactcggcca 60
tggttccctg gctgccagtg tgaggaagag acgtttggcc tctttgacag ttccagcctg 120
atccgagtgg actgcagcag cctgggcccc cacattgtgc ctgtgcccac ccctctggac 180
acagcccacc tggacctgtc ttccaaccgg ctagaaaccg tgaatgagtc agtcctggga 240
gggccaggct ataccacact ggctggcctg gatctcagtc acaacctcct caccagcatc 300
acgcccactg ccttctcccg ccttcgctac ctggagtcac tggacctcag tcacaatggc 360
ctggcagccc tgccagcaga ggttttcacc agctccccct tgagtgatat caacctgagc 420
cataatcgac ttagagaggt ctgatatatc gccttcacca ccacagcca ggggcgggca 480
ctgcaagtgg acctatccca caatcttacc caccgcctgc tcccctatcc agccagggcc 540
agcctgtccg cacctaccat tcagagcctg aacctgtcct ggaaccggct ccgagccgtg 600
cccgatctcc gagacctacc cctgcgttac ctgagcctgg atgggaaccc tctggctacc 660
atcaaccag gcgccttcat ggggctggcg ggcctcacc acctttcact ggcaagccta 720
cagggtatcc tccagctacc accccatggc ttccgagagc tcccaggcct tcaggctcctg 780

gacttgtctg gtaaccccaa gctcaagtgg gcaggagccg aggtattttc aggcctgggt 840
 ttgctgcaag aactagacct gtctggctcc agcctgggtgc ccctgcctga gacgctgcta 900
 catcacctcc ctgctttaca gagtgtcagt gtaggccaag atgtgcagtg ccggcgtctg 960
 gtacggggagg gtgcctacca ccgccaaccc ggttcagcc ctaaggtagt cctgcactgt 1020
 ggagacaccc aggaatctgc caggggcccc gacatottgt ga 1062

<210> 2

<211> 353

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 2

Met Leu Cys Thr Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Gln
 1 5 10 15

Thr Thr Arg Pro Cys Phe Pro Gly Cys Gln Cys Glu Glu Glu Thr Phe
 20 25 30

Gly Leu Phe Asp Ser Phe Ser Leu Ile Arg Val Asp Cys Ser Ser Leu
 35 40 45

Gly Pro His Ile Val Pro Val Pro Ile Pro Leu Asp Thr Ala His Leu
 50 55 60

Asp Leu Ser Ser Asn Arg Leu Glu Thr Val Asn Glu Ser Val Leu Gly
 65 70 75 80

Gly Pro Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Gly Leu Asp Leu Ser His Asn Leu
 85 90 95

Leu Thr Ser Ile Thr Pro Thr Ala Phe Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Glu
 100 105 110

Ser Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Ala Ala Leu Pro Ala Glu Val
 115 120 125

Phe Thr Ser Ser Pro Leu Ser Asp Ile Asn Leu Ser His Asn Arg Leu
 130 135 140

Arg Glu Val Ser Ile Ser Ala Phe Thr Thr His Ser Gln Gly Arg Ala
 145 150 155 160

Leu His Val Asp Leu Ser His Asn Leu Ile His Arg Leu Leu Pro Tyr
 165 170 175

Pro Ala Arg Ala Ser Leu Ser Ala Pro Thr Ile Gln Ser Leu Asn Leu
 180 185 190

Ser Trp Asn Arg Leu Arg Ala Val Pro Asp Leu Arg Asp Leu Pro Leu
 195 200 205

Arg Tyr Leu Ser Leu Asp Gly Asn Pro Leu Ala Thr Ile Asn Pro Gly
 210 215 220

Ala Phe Met Gly Leu Ala Gly Leu Thr His Leu Ser Leu Ala Ser Leu
 225 230 235 240

Gln Gly Ile Leu Gln Leu Pro Pro His Gly Phe Arg Glu Leu Pro Gly
 245 250 255

Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Gly Asn Pro Lys Leu Lys Trp Ala Gly
 260 265 270

Ala Glu Val Phe Ser Gly Leu Gly Leu Leu Gln Glu Leu Asp Leu Ser
 275 280 285

Gly Ser Ser Leu Val Pro Leu Pro Glu Thr Leu Leu His His Leu Pro
 290 295 300

Ala Leu Gln Ser Val Ser Val Gly Gln Asp Val Gln Cys Arg Arg Leu
 305 310 315 320

Val Arg Glu Gly Ala Val His Arg Gln Pro Gly Ser Ser Pro Lys Val
 325 330 335

Val Leu His Cys Gly Asp Thr Gln Glu Ser Ala Arg Gly Pro Asp Ile
 340 345 350

Leu

<210> 3

<211> 2557

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (14)..(1075)

<223>

<400> 3
 tccagccccc acc atg ccg tgg ccc ctg ctg ctg ctg ctg gcc gtg agt 49
 Met Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Ser
 1 5 10

ggg gcc cag aca acc cgg cca tgc ttc ccc ggg tgc caa tgc gag gtg 97
 Gly Ala Gln Thr Thr Arg Pro Cys Phe Pro Gly Cys Gln Cys Glu Val
 15 20 25

gag acc ttc ggc ctt ttc gac agc ttc agc ctg act cgg gtg gat tgt 145
 Glu Thr Phe Gly Leu Phe Asp Ser Phe Ser Leu Thr Arg Val Asp Cys
 30 35 40

agc ggc ctg ggc ccc cac atc atg ccg gtg ccc atc cct ctg gac aca 193
 Ser Gly Leu Gly Pro His Ile Met Pro Val Pro Ile Pro Leu Asp Thr
 45 50 55 60

gcc cac ttg gac ctg tcc tcc aac cgg ctg gag atg gtg aat gag tcg 241
 Ala His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Arg Leu Glu Met Val Asn Glu Ser
 65 70 75

gtg ttg gcg ggg ccg ggc tac acg acg ttg gct ggc ctg gat ctc agc 289
 Val Leu Ala Gly Pro Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Gly Leu Asp Leu Ser
 80 85 90

cac aac ctg ctc acc agc atc tca ccc act gcc ttc tcc cgc ctt cgc 337
 His Asn Leu Leu Thr Ser Ile Ser Pro Thr Ala Phe Ser Arg Leu Arg
 95 100 105

tac ctg gag tcg ctt gac ctc agc cac aat ggc ctg rca gcc ctg cca 385
 Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Xaa Ala Leu Pro
 110 115 120

gcc gag agc ttc acc agc tca ccc ctg agc gac gtg aac ctt agc cac 433
 Ala Glu Ser Phe Thr Ser Ser Pro Leu Ser Asp Val Asn Leu Ser His
 125 130 135 140

aac cag ctc cgg gag gtc tca gtg tct gcc ttc acg acg cac agt cag 481
 Asn Gln Leu Arg Glu Val Ser Val Ser Ala Phe Thr Thr His Ser Gln
 145 150 155

ggc cgg gca cta cac gtg gac ctc tcc cac aac ctc att cac cgc ctc 529
 Gly Arg Ala Leu His Val Asp Leu Ser His Asn Leu Ile His Arg Leu
 160 165 170

gtg ccc cac ccc acg agg gcc ggc ctg cct gcg ccc acc att cag agc 577
 Val Pro His Pro Thr Arg Ala Gly Leu Pro Ala Pro Thr Ile Gln Ser
 175 180 185

ctg aac ctg gcc tgg aac cgg ctc cat gcc gtg ccc aac ctc cga gac Leu Asn Leu Ala Trp Asn Arg Leu His Ala Val Pro Asn Leu Arg Asp 190 195 200	625
ttg ccc ctg cgc tac ctg agc ctg gat ggg aac cct cta gct gtc att Leu Pro Leu Arg Tyr Leu Ser Leu Asp Gly Asn Pro Leu Ala Val Ile 205 210 215 220	673
ggg ccg ggt gcc ttc gcg ggg ctg gga ggc ctt aca cac ctg tct ctg Gly Pro Gly Ala Phe Ala Gly Leu Gly Gly Leu Thr His Leu Ser Leu 225 230 235	721
gcc agc ctg cag agg ctc cct gag ctg gcg ccc agt ggc ttc cgt gag Ala Ser Leu Gln Arg Leu Pro Glu Leu Ala Pro Ser Gly Phe Arg Glu 240 245 250	769
cta ccg ggc ctg cag gtc ctg gac ctg tcg ggc aac ccc aag ctt aac Leu Pro Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Gly Asn Pro Lys Leu Asn 255 260 265	817
tgg gca gga gct gag gtg ttt tca ggc ctg agc tcc ctg cag gag ctg Trp Ala Gly Ala Glu Val Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu Gln Glu Leu 270 275 280	865
gac ctt tcg ggc acc aac ctg gtg ccc ctg cct gag gcg ctg ctc ctc Asp Leu Ser Gly Thr Asn Leu Val Pro Leu Pro Glu Ala Leu Leu Leu 285 290 295 300	913
cac ctc ccg gca ctg cag agc gtc agc gtg ggc cag gat gtg cgg tgc His Leu Pro Ala Leu Gln Ser Val Ser Val Gly Gln Asp Val Arg Cys 305 310 315	961
cgg cgc ctg gtg cgg gag ggc acc tac ccc cgg agg cct ggc tcc agc Arg Arg Leu Val Arg Glu Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Pro Gly Ser Ser 320 325 330	1009
ccc aag gtg gcc ctg cac tgc gta gac acc cgg gaa tct gct gcc agg Pro Lys Val Ala Leu His Cys Val Asp Thr Arg Glu Ser Ala Ala Arg 335 340 345	1057
ggc ccc acc atc ttg tga caaatggtgt ggcccagggc cacataacag Gly Pro Thr Ile Leu 350	1105
actgctgtcc tgggctgcct cagggtccga gtaacttatg ttcaatgtgc caacaccagt	1165
ggggagcccg caggcctatg tggcagcgtc accacaggag ttgtgggcct aggagaggct	1225
ttggacctgg gagccacacc taggagcaaa gtctcaccctc ttgtctacg ttgcttcccc	1285
aaaccatgag cagaggggact tcgatgccaa accagactcg ggtcccctcc tgcttccctt	1345
ccccacttat cccccaagtg ccttcctca tgctggggcc ggctgaccog caatgggcag	1405
agggtgggtg gaccctgct gcagggcaga gttcagggtcc actgggctga gtgtcccttg	1465
ggcccatggc ccagtcactc aggggcgagt ttcttttcta acatagccct ttctttgcca	1525
tgaggccatg agggccgctt catccttttc tatttcctta gaaccttaat ggtagaagga	1585

```

attgcaaaga atcaagtcca cccttctcat gtgacagatg gggaaactga ggccttgaga 1645
aggaaaaagg ctaatctaag ttcctgcggg cagtggcatg actggagcac agcctcctgc 1705
ctcccagccc ggaccaatg cactttcttg tctcctctaa taagccccac cctccccgcc 1765
tgggctcccc ttgctgccct tgcctgttcc ccattagcac aggagtagca gcagcaggac 1825
aggcaagagc ctcacaagtg ggactctggg cctctgacca gctgtgcggc atgggctaag 1885
tcactctgcc cttcggagcc tctggaagct tagggcacat tggttccagc ctagccagtt 1945
tctcaccttg ggttggggtc cccagcatc cagactggaa acctacccat tttcccctga 2005
gcatcctcta gatgtgcc ccaggagttg ctgcagttct ggagcctcat ctggctggga 2065
tctccaaggg gcctcctgga ttcagtcccc actggccctg agcacgacag cccttcttac 2125
cctcccagga atgccgtgaa aggagacaag gtctgcccga cccatgtcta tgctctaccc 2185
cagggtagca tctcagcttc cgaaccctgg gctgtttcct tagtcttcat tttataaaag 2245
ttgttgctt tttaacggag tgtcactttc aaccggcctc ccctaccct gctggccggg 2305
gatggagaca tgtcatttgt aaaagcagaa aaagggtgca tttgttact tttgtaatat 2365
tgtcctgggc ctgtgttggg gtgttggggg aagctgggca tcagtggcca catgggcac 2425
aggggctggc cccacagaga cccacaggg cagtgagctc tgtcttcccc cacctgccta 2485
gcccacatc tatctaaccg gtccttgatt taataaacac tataaaaagt taaaaaaaaa 2545
aaaaaaaaaa aa 2557

```

<210> 4

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> 'Xaa' en position 121 représente Ala ou Thr.

<400> 4

```

Met Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Ala Val Ser Gly Ala Gln Thr
1           5           10           15

```

```

Thr Arg Pro Cys Phe Pro Gly Cys Gln Cys Glu Val Glu Thr Phe Gly
          20           25           30

```

Leu Phe Asp Ser Phe Ser Leu Thr Arg Val Asp Cys Ser Gly Leu Gly
 35 40 45

Pro His Ile Met Pro Val Pro Ile Pro Leu Asp Thr Ala His Leu Asp
 50 55 60

Leu Ser Ser Asn Arg Leu Glu Met Val Asn Glu Ser Val Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Thr Thr Leu Ala Gly Leu Asp Leu Ser His Asn Leu Leu
 85 90 95

Thr Ser Ile Ser Pro Thr Ala Phe Ser Arg Leu Arg Tyr Leu Glu Ser
 100 105 110

Leu Asp Leu Ser His Asn Gly Leu Xaa Ala Leu Pro Ala Glu Ser Phe
 115 120 125

Thr Ser Ser Pro Leu Ser Asp Val Asn Leu Ser His Asn Gln Leu Arg
 130 135 140

Glu Val Ser Val Ser Ala Phe Thr Thr His Ser Gln Gly Arg Ala Leu
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Ser His Asn Leu Ile His Arg Leu Val Pro His Pro
 165 170 175

Thr Arg Ala Gly Leu Pro Ala Pro Thr Ile Gln Ser Leu Asn Leu Ala
 180 185 190

Trp Asn Arg Leu His Ala Val Pro Asn Leu Arg Asp Leu Pro Leu Arg
 195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Asp Gly Asn Pro Leu Ala Val Ile Gly Pro Gly Ala
 210 215 220

Phe Ala Gly Leu Gly Gly Leu Thr His Leu Ser Leu Ala Ser Leu Gln
 225 230 235 240

Arg Leu Pro Glu Leu Ala Pro Ser Gly Phe Arg Glu Leu Pro Gly Leu
 245 250 255

Gln Val Leu Asp Leu Ser Gly Asn Pro Lys Leu Asn Trp Ala Gly Ala
 260 265 270

Glu Val Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu Gln Glu Leu Asp Leu Ser Gly
 275 280 285

Thr Asn Leu Val Pro Leu Pro Glu Ala Leu Leu Leu His Leu Pro Ala
 290 295 300

Leu Gln Ser Val Ser Val Gly Gln Asp Val Arg Cys Arg Arg Leu Val
 305 310 315 320

Arg Glu Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Pro Gly Ser Ser Pro Lys Val Ala
 325 330 335

Leu His Cys Val Asp Thr Arg Glu Ser Ala Ala Arg Gly Pro Thr Ile
 340 345 350

Leu

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificiel : amorce

<400> 5
 attaaccctc actaaatgct ggggtg

25

<210> 6

<211> 31

<212> ADN

~~<213> Artificiel : amorce~~

<400> 6
 cattatgctg agtgatatct tttttttttt g

31

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificiel : amorce

<400> 7
acgcgggggg gtcgcctagg tg

22

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificiel : amorce

<400> 8
gatggaaaga gctcttacat gtgtttatt

29

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Codex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / .1.

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 770601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BFF 03P0604
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	030485

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Gène induit par l'insuline, comme cible thérapeutique dans le diabète.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

**MERCK SANTE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S)**

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	ASFARI
	Prénoms	Maryam
	Adresse	Rue
		94, rue Pierre Curie 91600 SAVIGNY sur ORGE FRANCE
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	COFFY
	Prénoms	Sandrine
	Adresse	Rue
		36 bis, rue de la Montagne 91380 CHILLY MAZARIN FRANCE
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	

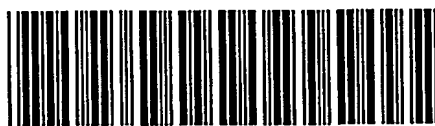
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

Paris, le 17 Avril 2003

Philippe Biot
Philippe Biot
n° 98.0404

EP_04/002809



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**